



# 乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT の基質輸送 メカニズムに関する研究

著者	鈴木 聡美
号	52
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農博第1155号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00122788">http://hdl.handle.net/10097/00122788</a>

すずき さとみ

氏名（本籍地） 鈴木 聡 美

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第 1155 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研究科，専攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）生物産業創成科学専攻

論文題目 乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate : Alanine 交換輸送体  
AspT の基質輸送メカニズムに関する研究

博士論文審査委員 （主査）教授 阿部 敬悦

教授 五味 勝也

准教授 米山 裕

論文内容要旨

乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate : Alanine  
交換輸送体 AspT の基質輸送メカニズムに関する研究

東北大学大学院 農学研究科  
生物産業創成科学専攻

鈴木 聡美

指導教員 阿部 敬悦 教授
------------------

## 序論

医薬品、食品、化成品等、多くの有用化合物の原料が微生物を利用して生産されている。その生産量改善の主たる手法は、大量培養系の確立や微生物の細胞内代謝の強化・改変によるものである。しかし一方で、極端な代謝制御は細胞内エネルギーレベルを低下させ、物質生産効率化の低下に繋がる。そこで注目したのが物質輸送に関与する“輸送体（トランスポーター）”である<sup>1),2)</sup>。輸送体の改変は、代謝反応の初期・最終段階にあたる取り込みや排出能を向上させ、一層の物質生産体系の強化が期待できる<sup>3)</sup>。

本博士研究で取り扱った輸送体は、乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* D10 株より単離されたアスパラギン酸 (Aspartate) : アラニン (Alanine) 交換輸送体 AspT という膜蛋白質である<sup>4)</sup>。AspT は二次性輸送体で、L-Alanine の細胞外への排出を駆動力に、L-Aspartate の細胞内への取り込みを 1:1 で行っている (Fig. 1)。細胞内に取り込まれた L-Aspartate は、AspT とオペロンを形成するアスパラギン酸脱炭酸酵素 AspD によって L-Alanine へと脱炭酸され排出されるが、この一連の輸送・脱炭酸過程で、膜を介したプロトン濃度勾配 ( $\Delta pH$ )、膜電位 ( $\Delta \Psi$ ) が生じる。これら proton-motive force (PMF) は ATPase によってエネルギー (ATP) へと変換され、菌の生存に利用される<sup>4),5)</sup>。AspT のように脱炭酸及びエネルギー生産共役反応を行う輸送体は、菌体内のエネルギーレベルを低下させずに物質生産と輸送を維持できることから、産業対象として有益と考えられる。また、AspT はグルタミン酸やコハク酸など<sup>6)</sup>、産業上有用なアミノ酸、有機酸を輸送する輸送体が多く保存されている Aspartate : Alanine Exchanger (AAEx) family のメンバーである。AAEx family の構成メンバーで、その機能が解明された膜蛋白質は少なく、AspT の輸送メカニズムの解明は産業的にも学術的にも重要な位置づけにあると考えられる。

AspT は 10 の膜貫通領域 (transmembrane domain ; TM) から成る<sup>7)</sup>。このうち、第 3 膜貫通領域 (TM3) は AAEx family 間で保存性が高く、脂質二重膜内という疎水的環境にありながら、基質が作用できる親水性領域や、荷電性アミノ酸残基の存在が確認されており、基質の透過経路と推察されている<sup>8)</sup> (Fig. 2)。また、AspT は L-Aspartate と L-Alanine とで異なる結合部位を有することも推察されている<sup>9)</sup>。しかし、AspT の基質結合に伴う構造変化と基質輸送との関係は明らかにされていない。本博士論文では、AspT の輸送モデルを考察するため、以下の研究に取り組んだ。

第一章では、SH 基に特異的に結合する蛍光修飾試薬を用いて、基質依存的な AspT の構造変化を解明し、キネティクスパラメータと共に、一連の基質輸送メカニズムに関して考察した。

第二章では、TM3 の特徴的モチーフ GxxxG motif 内のアルギニン (R76) 残基に焦点をあて、R76 を様々なアミノ酸残基に置換し、人工脂質二重膜小胞 (プロテオリポソーム) 再構成系を用いた輸送活性の解析から、輸送における R76 の機能を考察した。

## 第一章 蛍光修飾試薬を用いた基質依存的構造変化の解析

本研究室ではこれまで、AspT の親水性領域に導入した SH 基を特異的に修飾する蛍光試薬 Oregon Green 488 Maleimid (OGM) を用いて、基質の有無や種類による AspT 構成アミノ酸残基の環境変化を解析してきた<sup>4)</sup>。この手法により、基質の推定透過経路 TM3 に位置する 62 番目のグリシン (G)、79 番目のプロリン (P)、83 番目のセリン (S) 残基をシステイン (Cys, C) に置換した変異体は、L-Aspartate、L-Alanine 濃度依存的に周辺の親水・疎水度合いが変化することが確認されている (木村 修士論文, 2012)。また私は修士論文において、プロテオリポソームを用いた輸送活性測定から、L-Aspartate、L-Alanine は互いの輸送を阻害することを明らかにした。以上の解析から、AspT は基質の種類により異なる結合型コンフォメーションをとる、すなわち基質非結合 (apo) 型、Aspartate 結合型、Alanine 結合型、少なくとも 3 つの結合型コンフォメーションをとる可能性が示唆された。本章では、L-Aspartate、L-Alanine 共存下での OGM ラベル実験を行い、Cys 置換残基の周辺環境の変化から阻害形式を推察した。更に AspT に基質認識されるアナログ基質 (D-Aspartate、D-Alanine、L-Serine)<sup>9)</sup> においても Cys 置換残基の周辺環境の変化を確認することで、基質結合時の構造形態を解析した。

### 1) L-Aspartate、L-Alanine 共存下での影響

TM3 に位置し、L-Aspartate 存在で修飾効率が上昇、L-Alanine 存在で修飾効率が減少する P79C 変異体を用いて、L-Aspartate、L-Alanine 共存下での構造変化の解析を行った。その結果、L-Alanine 濃度を固定し、L-Aspartate 濃度を变化させた場合、L-Aspartate 濃度依存的に P79C の修飾効率は上昇した (Fig. 3A, B)。また、固定濃度が高くなるほど全体の修飾効率が抑制されていることも確認した (Fig. 3B)。反対に、L-Aspartate 濃度を固定した場合は、L-Alanine 濃度依存的に P79C の修飾効率が減少した (Fig. 3C, D)。これらの結果は、基質濃度依存的な結合型コンフォメーション間の推移を示しており、一方の基質結合が誘導する結合型コンフォメーションは、もう一方の基質結合を妨げると推察された。

### 2) D-Aspartate、D-Alanine、L-Serine 存在下での影響

P79C に加え、L-Aspartate、L-Alanine 存在下で修飾効率が減少する G62C を用いて構造変化の解析を行った。その結果、D-Aspartate は、濃度依存的に G62C で修飾効率が減少、P79C で修飾効率が上昇する、L-Aspartate と同様の变化を示した (Fig. 4A,B)。一方、D-Alanine 及び L-Serine は、G62C、P79C 共に濃度依存的な G62C、P79C 共に修飾効率の減少が確認でき、L-Alanine と同様の变化を示した (Fig. 4C-4F)。これら各アナログ基質において、プロテオリポソームに再構成した AspT を用いて Exchange reaction を行った。その結果、L-Aspartate アナログ基質は L-Aspartate の、L-Alanine アナログ基質は L-Alanine の輸送を選択的に阻害した (Fig. 5)。これらのことから、D-Aspartate は L-Aspartate と、D-Alanine 及び L-Serine は L-

Alanine と同様の構造変化を経て輸送が起こると同時に、L-Aspartate と L-Alanine は独立した輸送経路を有すると推察された。

以上 1)、2) 及び阻害実験の結果から、AspT の輸送モデルを考察した (Fig. 6)。

## 第二章 TM3 GxxxG motif 内アルギニン残基の機能解析

TM3 には、構造の安定化やオリゴマー形成に関与するとされる GxxxG motif が存在する<sup>10)</sup>。修士論文では TM3 構成アミノ酸残基の Cys 一置換変異体を用いて、L-Aspartate と L-Alanine の輸送能を解析した。その結果、アミノ酸残基ごとに輸送能は変化した。特に GxxxG motif に相当する変異体群は、他の領域に比べて大きな輸送能の低下がみられた。Size-Exclusion Chromatography でこれらの変異体は大きな構造の崩れを示さなかったことから、GxxxG motif は輸送に重要な部位であると推察した。

本研究では GxxxG motif 内で輸送機能に重要なアミノ酸残基を探索することとした。注目したアミノ酸残基は、モチーフ中間に位置する 76 番目のアルギニン (R) である。R76 はモチーフ内で唯一の荷電性残基である。また、GxxxG motif は AAEx family 間で保存性が高いが、R76 部位の保存性は低い (Fig. 7)。しかし、AAEx ファミリー輸送体において、R76 に位置するアミノ酸残基は親水性の高い残基として保存されている。これらの特徴から、R76 が AspT の基質輸送または基質認識に寄与している可能性があるとして推論した。そこで、R を中性アミノ酸残基であるアラニン (A)、グルタミン (Q)、塩基性アミノ酸残基であるヒスチジン (H)、リジン (K)、酸性アミノ酸残基であるアスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E) に置換した変異体とプロテオリポソーム再構成法を用いて、各変異体の L-Aspartate、L-Alanine それぞれの輸送能を確認した。

各変異体の輸送能は、L-Aspartate、L-Alanine 輸送のどちらの輸送においても活性の増減が類似の傾向にあった (Fig. 8)。最も輸送能が高く、WT に比べて 2 倍近い活性を示したのは塩基性アミノ酸残基の R76K であった。一方、酸性アミノ酸残基に置換した R76D、R76E は輸送能が低い傾向にあり、WT の 3 分の 1 程度の活性を示した。このことから、電荷の違いが基質輸送と輸送速度に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。しかし前述したように、L-Aspartate と L-Alanine 輸送どちらの輸送能も同様の傾向を示したことから、R の陽電荷が輸送基質の L-Aspartate の負電荷と直接相互作用しているわけではないと推測される。R76 は他の陰性アミノ酸残基と相互作用し、塩橋を形成することで構造の安定化に寄与している可能性が推察された<sup>11)</sup>。

様々な微生物が AAEx family 輸送体を有しているが、その中にはコハク酸やグルタミン酸排出能を持つホモログもあり、その機能は Aspartate:Alanine 交換輸送に限定

されるものではない。*T. halophilus* AspT において L-Aspartate、L-Alanine 輸送能を低下させた置換残基 E を、ThaAspT の R76 部位に相当するアミノ酸残基に持つホモログも存在する (Fig. 7)。ホモログ間における R76 部位の保存性の低さからも、R76 が基質の選択性などの機能に関与する可能性が推察された。

### 第三章 総合論議

AspT はこれまでに、TM3 が基質の推定透過経路を形成すること<sup>8)</sup>、基質結合部位が異なること<sup>9)</sup>が推察されてきた。本博士論文では、OGM ラベル実験及びプロテオリポソーム再構成系を用いた輸送活性測定を通じて AspT の基質結合とそれに伴う構造変化を調べることで、輸送メカニズムの一端を解明することができた。すなわち、輸送基質である L-Aspartate と L-Alanine は異なる結合型コンフォメーションをとり、一方の結合により誘導される構造変化は、もう一方の基質結合の親和性を低下させること、そして L-Aspartate と L-Alanine は独立した輸送経路を有することを示した (Fig. 6)。生理的環境において、*T. halophilus* は脱炭酸反応共役的な Aspartate : Alanine 交換輸送反応によって生じる膜電位を使ってエネルギーを生産している。基質が同時に結合できた場合、一方の基質が枯渇していないにも関わらず、ヘテロ交換輸送からホモ交換輸送へと切り替わってしまう可能性がある。この場合、膜電位を発生することができなくなってしまう。本研究で明らかになった、基質結合型コンフォメーション間の競合は、エネルギー生産と回収という点で、生理的に重要なメカニズムと推察される。しかし、解析した部位は構造変化の一端に過ぎない。L-Aspartate と L-Alanine の結合部位がどの程度近接しているのか、本当に同時に結合しうることはないのか、そして基質輸送の切り替えはどのように起こっているのかなど、不明な点も多い。今後は解析部位を更に広げることや、L-Aspartate、L-Alanine 両方の基質輸送を同時に計測する解析手法が必要になると考えられ、現在検討を進めている。

GxxxG motif の R76 に焦点をあてた輸送能解析では、R の陽性電荷が陰性電荷を有するアミノ酸残基と相互作用し、構造の安定化に寄与する可能性、及び基質の選択性に関与する可能性が推察された。GxxxG motif は TM3 以外にも複数個所存在する。GxxxG motif を介してモノマー間、あるいはオリゴマー間で相互作用していると推察されることから、R76 の相互作用部位含め、GxxxG motif が AspT の活性構造の維持にどのように関与しているかを明らかにすることは今後の課題であり、結晶化が重要であると考えられる。R76 の基質選択性に関しては、L-Aspartate や L-Alanine 以外の基質を用いて輸送能解析を実施しすることで、関与を裏付けることができる可能性がある。また、本研究で R76K が WT の約 2 倍の輸送能を示したことは、一アミノ酸置換によって AspT の輸送速度の上昇、すなわち分子比活性の上昇に繋がったことを意味している。R76K は WT 含む他の変異体に比べて発現量が高かったことから、輸

送体への変異導入による機能強化が可能である事を示した。微生物による発酵産業において、輸送体の改変による物質生産の効率化を期待させる結果となった。

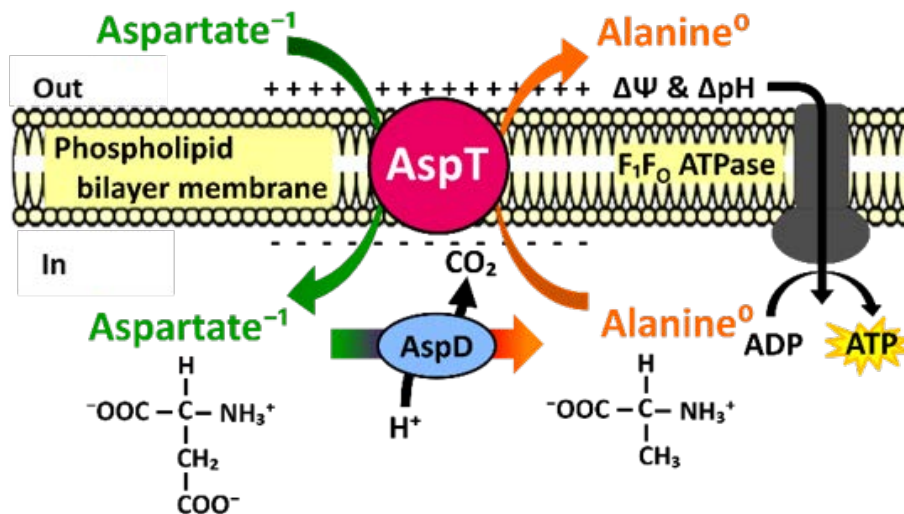
本博士論文研究では、輸送の **Kinetics** 解析と輸送体蛋白質の蛍光修飾解析を組み合わせることで、基質結合による **AspT** のコンフォメーション変化という輸送体の動的一面を捉え、新たに **AspT** の基質輸送反応モデルを考察するに至った。膜蛋白質の高い疎水性に起因する発現量の低さ、輸送反応解析系の設計の難しさ、排出輸送体の著しい  $K_m$  の高さなど、排出輸送反応の測定には技術的な難しさがある。このような中で、輸送とエネルギー生産の両方を達成でき、産業上有用な **AAEx family** 輸送体のプロトタイプである **AspT** の基盤的研究は産業的意義が大きい。本研究では、輸送体の産業応用への礎として輸送体機能改変による機能強化の可能性も示すことができたことは、学術的にも産業的にも重要な知見であったと考えている。

## 引用文献

- 1) Nakamura J. *et al.*, *Appl. Environ Microbiol* 2007; 73:4491-4498.
- 2) Enquist-Newman M. *et al.*, *Nature* 2014; 505:239-243.
- 3) Yamashita C. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013; 77:1008-1013.
- 4) Abe K. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1996; 271:3079-3084.
- 5) Abe K. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2002; 184:2906-2913.
- 6) Fukui K. *et al.*, *J Biotechnol.* 2011; 154:25-34
- 7) Nanatani K. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2007; 189:7089-7097.
- 8) Nanatani K. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2009; 191:2122-2132.
- 9) Sasahara A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2011; 286:29044-29052.
- 10) Russ WP. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2000; 296:911-919.
- 11) Walther TH. *et al.*, *Curr Opin Struct Biol.* 2014; 27:63-8

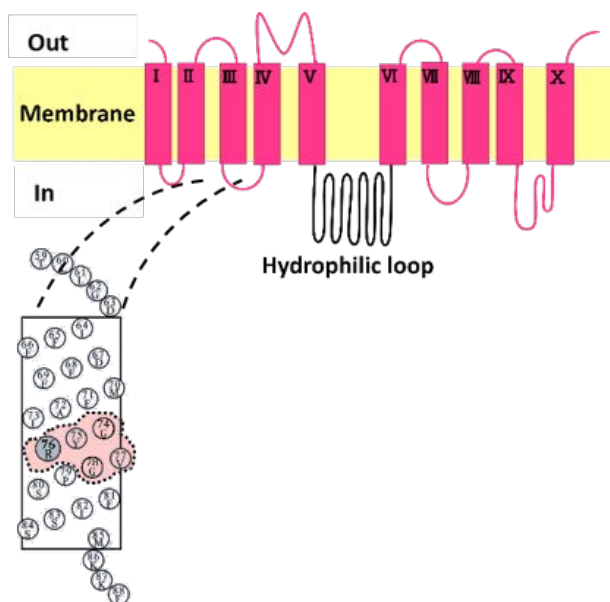


Fig.1

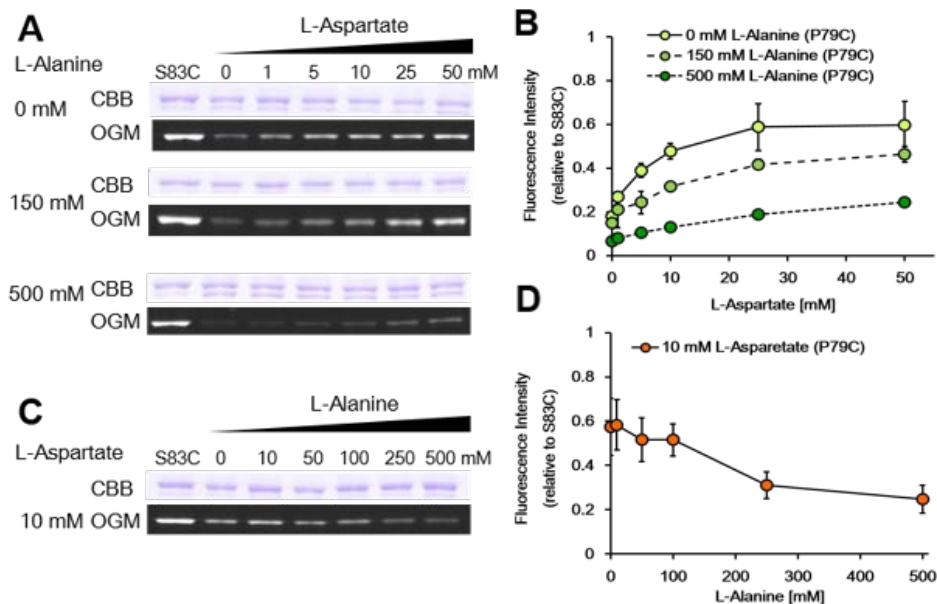


**L-Aspartate : L-Alanine exchange reaction.** AspT imports extracellular L-Aspartate into the cell and releases intracellular L-Alanine to the extracellular milieu. AspT acts in conjunction with aspartate decarboxylase (AspD) to create a proton concentration gradient and a potential across the cell membrane, contributing to ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase.

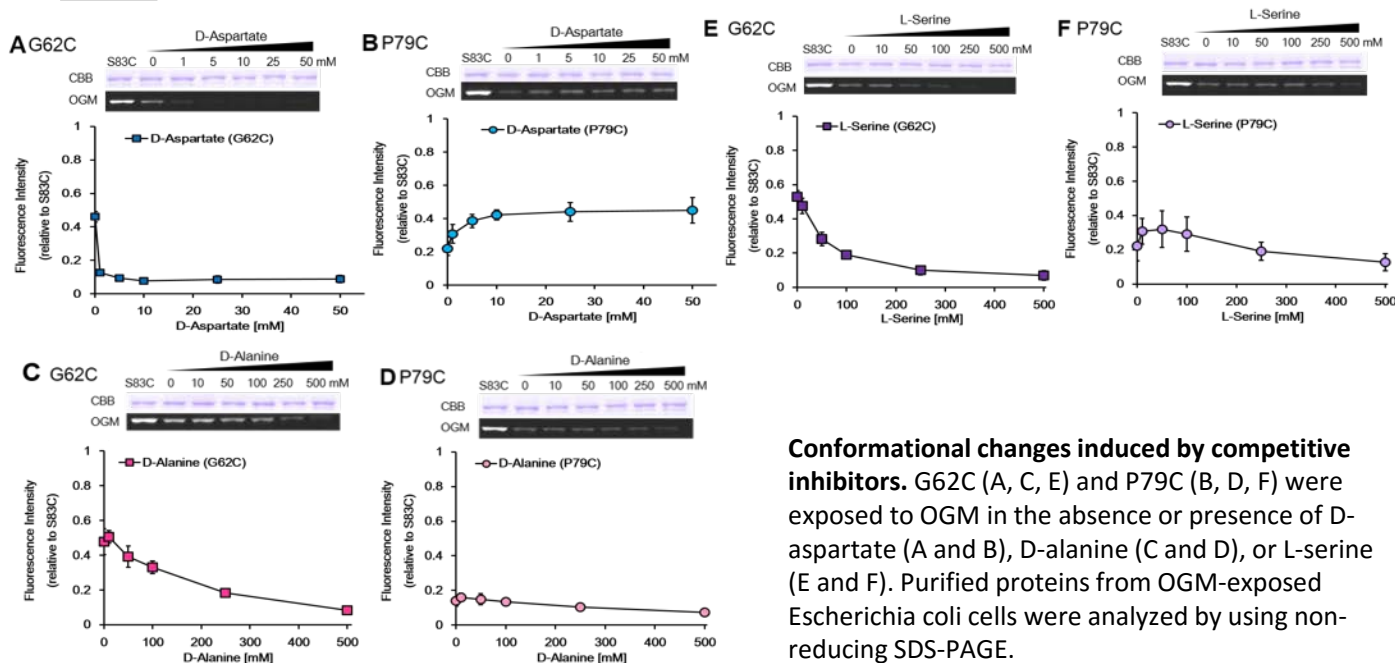
Fig.2



**Transmembrane domain 3 (TM3 ; Ile64–Met85) of AspT.** TM3 contains several hydrophilic amino acid residues, some of which are conserved among members of the AAEx family. In addition, TM3 possess the GxxxG motif (●) in the central part which helps to stabilize their structure via helix-helix interactions.

**Fig.3**

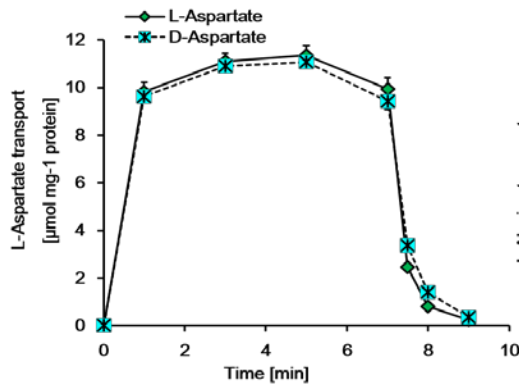
**Competitive effects of two native substrates on Oregon Green maleimide (OGM) labeling.** P79C was OGM labeling under conditions in which two native substrates were present. *Escherichia coli* cells that expressed P79C were exposed to OGM in the presence of (A and B) various concentrations of L-Aspartate with fixed L-Alanine concentrations (0 mM; ●, 150 mM; ●, 500 mM; ●) or (C and D) various concentrations of L-Alanine with fixed L-Aspartate concentration (10 mM; ●). Purified proteins from OGM-exposed *E. coli* cells were analyzed by using non-reducing SDS-PAGE as described in legend to Fig. 2. (B, D) The levels of fluorescence intensities and CBB staining under non-reducing SDS-PAGE were normalized against the corresponding levels of the S83C variant. The labeling efficiency of cysteine in P79C variant is shown as a ratio of the normalized level of fluorescence intensity and CBB staining.

**Fig.4**

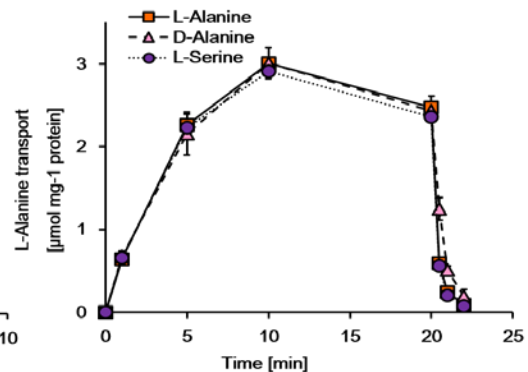
**Conformational changes induced by competitive inhibitors.** G62C (A, C, E) and P79C (B, D, F) were exposed to OGM in the absence or presence of D-aspartate (A and B), D-alanine (C and D), or L-serine (E and F). Purified proteins from OGM-exposed *Escherichia coli* cells were analyzed by using non-reducing SDS-PAGE.

Fig. 5

A

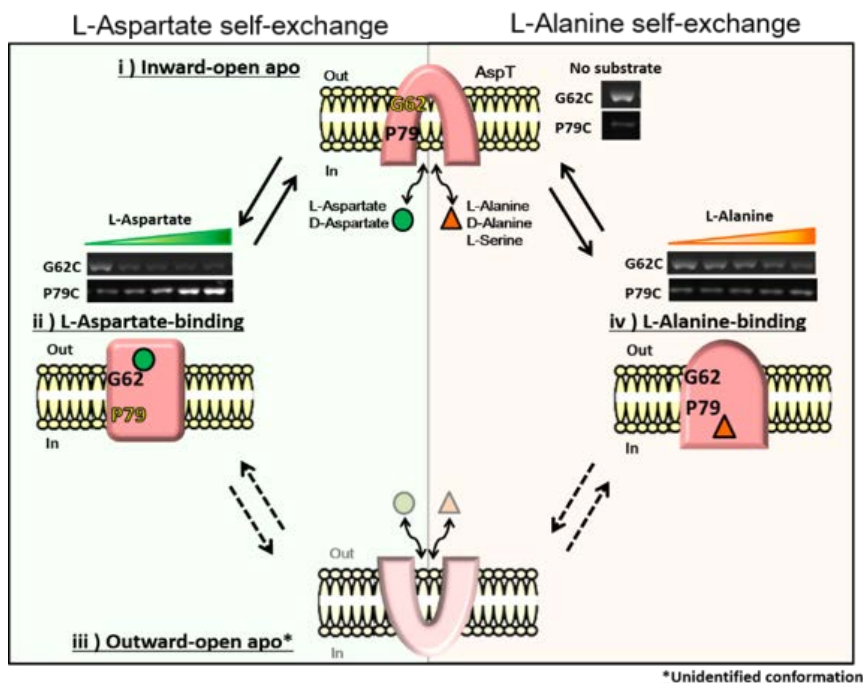


B



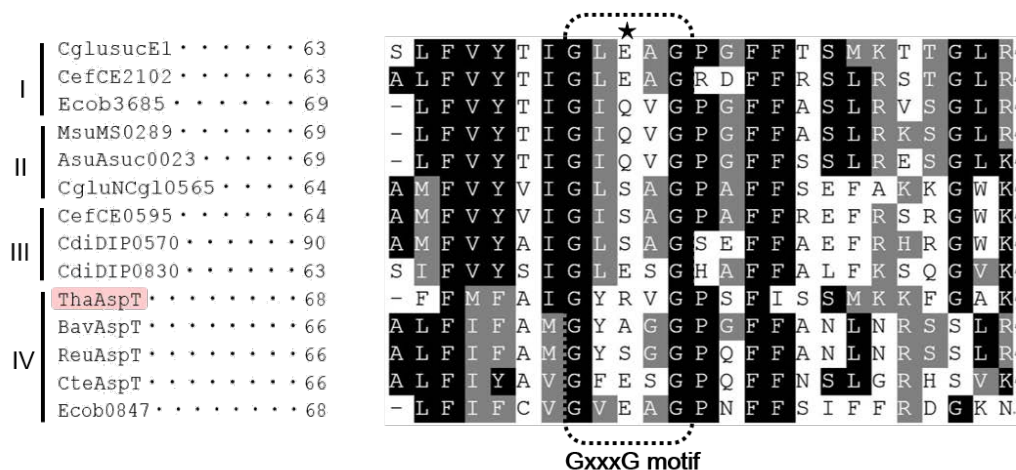
**Substrate and inhibitor exchange reactions using AspT-reconstituted proteoliposomes.** Proteoliposomes were loaded with 50 mM L-Aspartate (A) or L-Alanine (B) plus 50 mM potassium phosphate (pH 7) and then washed and resuspended as described in the Experimental Procedures. Proteoliposomes were placed in 50 mM  $K_2SO_4$  plus 50 mM potassium phosphate (pH 7) at 10 mg of protein/ml, at which point 0.025 mM L-[ $^3H$ ]Aspartate (A) or 0.017 mM L-[ $^3H$ ]Alanine (B) was added. To estimate substrate transport, aliquots were taken for filtration and washing at the times indicated. Arrow denotes the addition of buffer, 50 mM unlabeled L-Aspartate (◆) and D-Aspartate (✱), L-Alanine (■), D-Alanine (△), or L-Serine (●).

Fig. 6



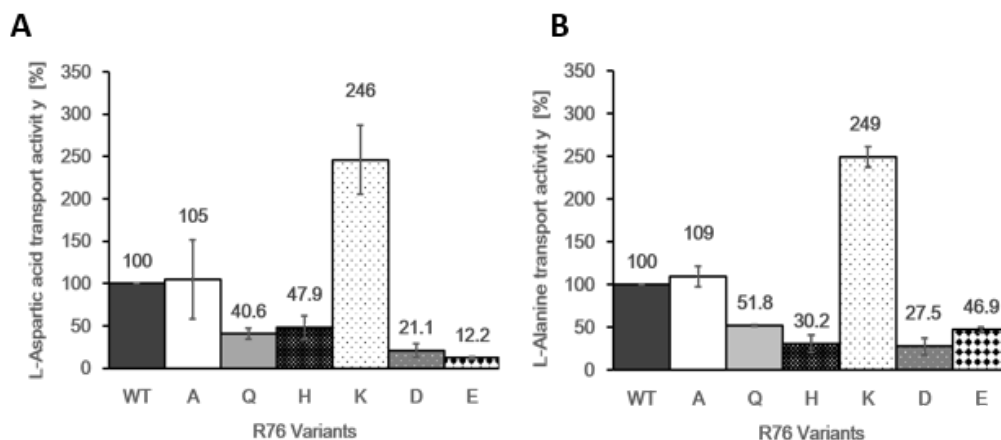
**Schematic representation of the AspT substrate transport cycle.** (Left-hand column) Schematic representation of the L-Aspartate self-exchange reaction. L- or D-Aspartate is indicated by filled circles (●). Conformational changes are shown from the inward-open apo state (i) or the outward-open apo-state (iii) to the L-aspartate binding state (ii), and from the occluded (ii) to the postulated open apo state and release of substrate. G62C is exposed to Oregon Green maleimide (OGM) only in the apo state (i or iii), and P79C is exposed to OGM in the L-aspartate binding-state (ii). (Right-hand column) Schematic representation of the L-Alanine self-exchange reaction. L- or D-Alanine, or L-Serine is indicated by the gray triangles (▲). Binding of L-Alanine induces the occluded state (iv), in which neither G62 nor P79C is exposed to OGM.

Fig. 7



**Multiple sequence alignment of members of the AAEx family of transporters.** An alignment of multiple sequences was generated with ClustalW. The chosen matrix was BLOSUM, with penalties of 10 (gap open) or 0.05 (gap extension). The resulting alignment was optically improved with the Boxshade program. Conserved residues are highlighted in black (identical to consensus) or gray (similar to consensus). Clusters I and II are sets of orthologous corynebacterial proteins. Cluster III is the set of orthologous  $\gamma$ -proteobacterial proteins. Cluster IV is the set of AspT homologs.

Fig. 8



**Analysis of the L-Aspartate (A) or L-Alanine (B) transport capacity of R76 variants.** Proteoliposomes were loaded with 100 mM L-Aspartate (A) or 50 mM L-Alanine (B), and their uptake of [ $^3$ H]-labelled L-Aspartate (A) or L-Alanine (B) during a 1-minute reaction was measured using the R76 variants reconstituted into the proteoliposomes. The uptake reaction was terminated after 1 minute by use of filtration and washing. The ordinate shows the transport activity ( $\mu\text{mol mg protein}^{-1}$ ) as a percentage of the WT activity.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	鈴木 聡美
審 査 委 員	主査：教授 阿部 敬悦 副査：教授 五味 勝也 准教授 米山 裕
学 位 論 文 題 目	乳酸菌 <i>Tetragenococcus halophilus</i> 由来 Aspartate : Alanine 交換輸送体 AspT の基質輸送メカニズムに関する研究

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

医薬品、食品、化成品など、多くの有用化合物の原料が微生物を利用して生産されている。その生産量改善の主たる手法は、大量培養系の確立や細胞内代謝の強化・改変によるものである。しかし、極端な代謝制御は細胞内エネルギーレベルを低下させ、物質生産効率化の低下に繋がる。そこで注目したのが、物質輸送に関与する蛋白質“輸送体”である。輸送体の改変は、代謝反応の初期・最終段階にあたる基質の取り込みや排出能の向上に繋がり、一層の物質生産体系の強化が期待できる。

候補者の研究は、醤油醸造に利用される乳酸菌由来の輸送体蛋白質 “Aspartate: Alanine 交換輸送体 AspT” の物質輸送機構の解明に取り組んだものである。本研究において、候補者は以下の事項を明らかにした。

(1) AspT の基質結合に伴うコンフォメーション変化と基質輸送との関係  
Cysteine 置換変異体と SH 基修飾蛍光試薬を用いたラベル実験によって、L-

Aspartate、L-Alanine 各基質結合時のコンフォメーションは基質特異的であり、他の基質の AspT への結合親和性を低下させるため、基質共存下では各結合型コンフォメーションは競合することを示した。また、アナログ基質存在下でのラベル実験から、各アナログ基質は L-Aspartate、L-Alanine 特異的な結合型コンフォメーションを誘導することを明らかにした。更に、AspT は、Aspartate : Alanine 交換輸送経路の他、互いの結合型コンフォメーションを介さない、独立した Aspartate : Aspartate または Alanine : Alanine 自己交換輸送経路を有することを明らかにした。

(2) 第 3 膜貫通領域 (TM3) GxxxG モチーフ内の 76 番目残基の機能解析  
基質の推定透過経路 TM3 内には、構造安定化に寄与するとされる GxxxG モチーフが存在する。このモチーフの中央に位置する 76 番目のアルギニン (R) 以外は、AspT ホモログ間で保存性が高く、76 番目の残基は疎水的環境にありながら極性アミノ酸残基で保存されている。そこで、R76 を様々なアミノ酸残基に置換した変異体を用いて、L-Aspartate、L-Alanine 各輸送能の差から R76 の機能を解析した。その結果、R76 の陽性電荷は輸送基質の陰性 L-Aspartate と特異的に反応するのではなく、AspT を構成する他の陰性アミノ酸残基と相互作用することで、AspT の活性構造の安定化に寄与していると推察された。また、R76 が基質の選択性に関与する可能性が示唆された。

以上、候補者の研究は、AspT の新たな基質輸送メカニズムモデルの考察に至った。これらは学術的にも、産業的にも有用な成果と考えられ、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。